Münster.1932.№ 63 Med Diss.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. Westf.
Direktor: Prof. Dr. H. Freund.

Ueber das Vorkommen von Adenylsäure im Tierkörper

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität
zu Münster i. Westf.

Vorgelegt von
Heinz Schneider
aus Lebach a. d. Saar

1931

Verlagsanstalt F. X. Ruegenberg, Olpe i. W.

Referent: **Prof. Dr. K. Zipf.**
Coreferent: **Prof. Dr. H. Freund.**
Dekan: **Prof. Dr. Herzog.**

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

„Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster/Westf."

Dekan:
Prof. Dr. Herzog

Berichterstatter:
Prof. Dr. K. Zipf.

1932

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Die blutdrucksenkende Wirkung frischer wässeriger und alkoholisch-wässeriger Extrakte aus Organen und Blut ist nach Zipf [1]) in der Hauptsache auf den Gehalt an Adenylsäure zurückzuführen. Ihr Vorkommen im tierischen Körper ist schon länger bekannt. Wahrscheinlich wird es nicht nur postmortal durch Zerfall von Kernsubstanzen (Nukleoproteide), sondern auch in vivo gebildet. Im Darm werden die Nukleinsubstanzen der Nahrung bis zu den Nukleosiden (Adenosin, Guanosin usw.) abgebaut, als solche resorbiert und gelangen damit ins strömende Blut. Bass [2]) und Jackson [3]) haben im Blute Adenylsäure nachgewiesen. Hoffmann [4]) stellte aus frisch defibriniertem Schweineblut kristallinisches Adeninnukleotid dar. Adenylsäure ist nach Buell und Perkins [5]) wahrscheinlich das einzige im Blute vorkommende Nukleotid. Andere Nukleotide, wie z. B. die Guanylsäure, fehlen im Blute oder sind nur in verschwindend kleiner Menge darin enthalten. Als mittleren Adenylsäuregehalt in frisch defibriniertem menschlichen Blute werden 17,9 mg% angegeben. Baß fand zwischen 16 und 45 mg%, Thannhauser und Czoniczer [6]) stellten im menschlichen Blut 15,5 mg% fest.

Neben der Adenylsäure ist im Blute noch mit dem gleichartig, aber stärker wirkenden Adenosin [1]) zu rechnen. Ferner ist das Vorkommen von Adenylpyrophosphorsäure nicht ausgeschlossen.

Außer im Blut und Serum ist Adenylsäure in zahlreichen Organen nachgewiesen, z. B. im quergestreiften Muskel [7]), Pankreas [8]), Niere [9]), Herz [10]), Gehirn [11]) und Lunge [12]). Frisch bereitete Pressäfte, wässerige und alkoholisch-wässerige Extrakte aus diesen Organen haben eine ähnliche Wirkung auf den Kreislauf wie Blutextrakte. Diese ist nach Zipf [1]) ebenfalls auf den Gehalt an Adenylsäure zurückzuführen.

Aber auch eine Reihe von therapeutisch verwendeten Organextrakten enthalten nach Zipf Adenylsäure allein oder neben anderen wirksamen Stoffen. Hierher gehören z. B. Lacarnol, Myoston u. a.

Die Adenylsäure ist demnach ein im Organismus weitverbreitetes Intermediär- oder Zerfallsprodukt. Die Untersuchung der quantitativen Verteilung war Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Bei Beginn der Untersuchungen lagen außer den bereits erwähnten nur einige Befunde von Zipf [1]) vor. Mittlerweile sind weitere Angaben von Bennet und Drury [13]) und von Rothmann [14]) er-

schienen. Erstere haben auf biologischem Wege den Adenylsäuregehalt der einzelnen Gewebe ermittelt, letzterer bestimmte auf chemischem Wege den Gehalt im menschlichen Blute bei verschiedenen Erkrankungen.

Die quantitative Bestimmung von biologisch-wirksamen Stoffen ist prinzipiell auf zwei Wegen möglich: 1) biologisch, 2) chemisch. Als biologische Teste kommen für die Adenylsäure in Frage die blutdrucksenkende Wirkung, die erregende Wirkung auf den isolierten Meerschweinchenuterus und die hemmende Wirkung auf den Kaninchendünndarm. Alle diese Methoden wurden versucht.

Die Auswertung am Blutdruck erwies sich in Uebereinstimmung mit zahlreichen früheren Versuchen von Zipf und Wagenfeld als sehr ungenau und damit für quantitative Zwecke unbrauchbar. Die Stärke der Blutdrucksenkung kann zwar der Gabengröße parallel gehen, tut es aber in zahlreichen Fällen nicht. Es liegen ähnliche Verhältnisse vor wie beim Histamin, dessen Auswertung am Blutdruck nach Ellinger [15]) ungenau ist. Dazu kommt, daß die Blutdrucksenkung keine spezifische Adenylsäurewirkung darstellt. Andere aus Organextrakten isolierte Stoffe wie Histamin und Acetylcholin senken ebenfalls den Blutdruck. Auch die Veränderung der Pulsamplitude durch Adenylsäure erwies sich zur quantitativen Auswertung als nicht geeignet. Wesentlich empfindlicher zeigte sich als Testobjekt der überlebende Meerschweinchenuterus. Doch gilt hierfür auch, daß die Methode nicht spezifisch genug ist, da Histamin und Acetylcholin ebenfalls erregen, und zwar in noch kleineren Dosen als Adenylsäure, sodaß schon eine geringe Beimengung solcher Stoffe das Resultat fälschen müßte.

Es bleibt deshalb als biologischer Test noch die hemmende Wirkung auf den Kaninchendünndarm. Die Reaktion schien für Adenylsäure spezifisch und auch empfindlich genug zu sein. Die Blut- und Organextrakte von Kaninchen und Hunden wurden mit der Methode am Kaninchendünndarm ausgewertet.

Die Herstellung der Extrakte geschah in folgender Weise: Kaninchen oder Hunde wurden in Narkose durch Entbluten aus der Carotis getötet. Das Blut wurde durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert und mit demselben Volumen 0,85%iger Kochsalzlösung versetzt. Die lebensfrischen Organe wurden möglichst rasch in der Fleischmaschine oder die kleinen Organe mit der Cooperschere fein zerkleinert und ebenfalls mit derselben Gewichtsmenge 0,85%iger Kochsalzlösung versetzt. Nachdem Blut und Organe so aufgearbeitet waren, wurde zu allen gleichzeitig die dem Blut- oder Organgewicht entsprechende Menge 20%iger Tri-

chloressigsäure zugesetzt. Der Trichloressigsäurezusatz geschah immer ½ Stunde nach dem Tode des Versuchstieres. Die Innehaltung eines bestimmten Zeitintervalls zwischen Tod des Tieres und Enteiweißung ist notwendig wegen des postmortalen fermentativen Abbaues der wirksamen Substanz. Mit der Enteiweißung wurden alle fermentativen Prozesse unterbrochen. Nach 8—12 Stunden Stehen bei Zimmertemperatur wurde abgepreßt und filtriert. Die Filtrate wurden mit 33%iger Natronlauge neutralisiert und waren eiweißfrei. (Sulfosalizylsäureprobe.) Konnte der chemische Nachweis nicht sofort angeschlossen werden, so wurde zur Konservierung 0,3% Trikresol zugesetzt. Die Auswertung am Kaninchendünndarm geschah immer mit trikresolfreien Extrakten.

Der isolierte Kaninchendünndarm wurde in der von Magnus angegebenen Anordnung verwendet. Als Maß der Wirkung wurde diejenige Dosis gewählt, die eben komplette Hemmung hervorrief. Vor und nach jedem Versuch wurde jedes Darmstückchen mit reiner Adenylsäure auf seine Empfindlichkeit geprüft. Das in den Extrakten enthaltene trichloressigsaure Natrium erwies sich in den in Frage kommenden Konzentrationen als nicht störend. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I und II zusammengefaßt. Es ergibt sich daraus, daß die in den Organextrakten von Hunden und Kaninchen enthaltenen Stoffe, die auf den Kaninchendünndarm hemmend wirken, adenosinartiger Natur (Adenosin, Adenylsäure oder Adenylpyrophosphorsäure) sind. Die größte Wirkungsstärke besitzen Extrakte aus Leber- und Herzmuskel. Am wenigsten wirken die Gehirnextrakte. Die Wirkungsstärken der übrigen Organextrakte liegen dazwischen. Unter der Annahme, daß die gesamte Wirksamkeit auf Adenylsäure bezogen werden kann, sind durch Vergleich mit der Wirkungsstärke der bekannten Adenylsäurelösung die Vergleichswerte errechnet.

Das Gehirn macht insofern eine Ausnahme, als in seinen Extrakten nicht immer nur darmhemmende, sondern auch darmerregende Stoffe enthalten waren. Ueber die Natur dieses darmerregenden Prinzips kann nur soviel ausgesagt werden, daß es sich nach Versuchen von Zipf nicht um Acetylcholin und auch nicht um Histamin handelt. Dagegen ist die darmerregende Komponente des Hypophysenhinterlappenhormons nicht auszuschließen. Mit diesen Befunden erscheint die Tauglichkeit des Darms als Testobjekt ebenfalls in Frage gestellt; denn auch in anderen Organextrakten ist mit der Anwesenheit solcher darmerregenden Stoffe zu rechnen. Freund hat schon in seinem „Spätgift" einen

Tabelle I

Kaninchen	
Extrakt aus:	Errechneter mittlerer Adenylsäuregehalt pro 100 Gramm Frischgewebe mg
Leber	450
Lunge	298
Niere	294
Skelettmuskel	276
Herzmuskel	445
Uterus	333
Gehirn	145
Blut, defibrin.	285

Tabelle II

Hund	
Extrakt aus:	Errechneter mittlerer Adenylsäuregehalt pro 100 Gramm Frischgewebe mg
Leber	336
Lunge	477
Niere	431
Skelettmuskel	533
Herzmuskel	380
Gehirn	500
Blut, defibrin.	500
Pankreas	593
Milz	667

solchen Stoff in längere Zeit gestandenem defibriniertem Blute nachgewiesen. Dasselbe ist von Zipf für Organpressäfte und von Hülsmeier für Alkoholextrakte aus solchen Organen nachgewiesen worden. Durch Guttentag [16]) ist ihr Vorkommen im frischen nativen Blut und in alkoholischen Extrakten aus frisch defibriniertem Blut neuerdings ebenfalls sichergestellt worden. Die Wirkung des Freund'schen „Spätgiftes" wird im frischen Blut und seinen Extrakten verdeckt durch die Adenylsäure, die „depressorische Komponente" des Frühgiftes. Andererseits wird die darmhemmende Wirkung der adenosinartigen Stoffe abgeschwächt werden müssen durch die erregende Wirkung des „Spätgiftes".

Die Auswertung adenosinartiger Stoffe am isolierten Kaninchendünndarm kann also nicht genau sein. Die Methode hat nur bedingten Wert.

Damit blieb nur noch die chemische Bestimmung der adenosinartigen Stoffe. Für diese steht die von Jackson [3]) ausgearbeitete Uranylmethode zur Verfügung. Sie gestattet allerdings nur die Bestimmung der Adenylsäure, während Adenosin nicht erfaßt wird.

Das Prinzip der Methode besteht in Folgendem:

Die Adenylsäure wird in schwach phosphathaltiger Lösung durch Uranylnitrat quantitativ gefällt. Nach Zerlegung der Fällung mit Natronlauge wird im Filtrat der Nukleotidsticktsoff nach Kjeldahl bestimmt und auf Adenylsäure umgerechnet. Die mit der Kjeldahlmethode erhaltenen N-Werte stellen den Nukleotid-N dar. Nach Vorgang von Jackson wurde daraus durch Multiplikation mit 5 — Adenylsäure enthält rund 20% N — der Adenylsäurewert errechnet. Von der Originalmethode von Jackson wurde nur insofern abgewichen, als nicht Folin-Wu-Filtrate, sondern entsprechend der Verarbeitung der Extrakte Trichloressigsäurefiltrate verwendet wurden. Die Verwendbarkeit der letzteren war durch Kontrollbestimmungen mit reiner Adenylsäure vorher festgestellt worden. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Eine gemessene Menge Trichloressigsäurefiltrat wurde im Zentrifugenglas mit 0,5 ccm 20%iger Uranylnitratlösung gefällt; nach kurzem Stehen wurde 10 Minuten lang zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand zweimal mit je 5 ccm 0,4%iger Kochsalzlösung gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde nach dem Zentrifugieren jeweils abgegossen. Der Rückstand wurde mit 0,5 ccm 4%iger Natronlauge zerlegt und nach Zugabe von 7 ccm aq. dest. 10 Minuten lang scharf zen-

trifugiert. Von der dekantierten überstehenden Flüssigkeit wurden 6 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen III und IV enthalten. Uebereinstimmend mit den Darmversuchen wurde in allen Organen Adenylsäure gefunden. Die Verteilung der Adenylsäure auf die einzelnen Organe ist beim Kaninchen und Hund nicht ganz gleich. Nach dem Adenylsäuregehalt geordnet ergibt sich beim Kaninchen folgende Reihe: Uterus > Leber > Skelettmuskel > Herzmuskel > Niere > Gehirn > Lunge > Blut. Das Pankreas des Kaninchens konnte wegen seiner Kleinheit nicht zur Herstellung von Extrakten verwendet werden. Für die Organe des Hundes lautet die Reihe: Skelettmuskel > Niere > Milz > Leber > Pankreas > Herzmuskel > Gehirn > Blut > Lunge. Auffallend ist der hohe Adenylsäuregehalt des Kaninchenuterus. Da

Tabelle III

Kaninchen						
Extrakt aus:	mg. Adenylsäure in 100 gr. Frischgewicht				Mittl. Adenylsäuregehalt pro 100 gr. Frischgew. mg.	mg. Adenylsäure nach Bennet und Drury pro 100 gr. Frischgew.
Leber	40 49	43,5 67,4	72,3 69	73,5 78	59,07	50
Lunge	59 37	47,8 17	32 12	23,7 28	42,06	9; 8
Niere	34,5 35	27,1 77	32 33	66,5 36	42,57	50
Skelettmuskel	40,3 62	50 63	80,5 52	79 59	60,7	50; 60
Herzmuskel	27,5 54	86 44	36,7 49	75 61	54.17	60; 40; 70
Uterus	180				180	15
Gehirn	22,6	44,3	39	29	34,22	8; 12
Blut, defibrin.	37,2 38	65,3 15	22 17	25 19	33,5	> 2 (Serum) > 3 (Blutzellen)

Tabelle IV

Hund						
Extrakte aus:	mg Adenylsäure in 100 gr. Frischgewicht				Mittl. Adenylsäuregehalt pro 100 gr. Frischgew. mg.	mg. Adenylsäure nach Bennet und Drury pro 100 gr. Frischgew.
Leber	42	63	72	54	57,5	
Lunge	93	87	76	102	94,5	
Niere	99	65	59	81	66,0	
Skelettmuskel	20,6	37	43	31	32,9	60; 60; 65
Herzmuskel	21,8	15	17	27	20,2	
Blut, defibr.	19	25	28	22	23,5	
Gehirn	12,1	44,8	31	25	28,23	
Pankreas	38,2	42,9			40,6	
Milz	64,2	52			58	

hier aber nur ein Versuch vorliegt, muß der Befund noch durch weitere Bestimmungen sichergestellt werden. Die Gehirnextrakte enthielten alle Adenylsäure, auch in jenen Fällen, wo sie eine darmerregende Wirkung entfalteten. Die Einzelwerte zeigen zum Teil nicht unbeträchtliche Schwankungen, ein Befund, den auch andere Autoren (Rothmann [14]), Buell und Perkins [5])) erhoben haben.

Ein Vergleich der chemisch bestimmten Adenylsäurewerte mit denen durch Auswertung am Darm berechneten ergibt die auffallende Tatsache, daß letztere wesentlich höher liegen, obwohl eher mit der Beimengung darmerregender Stoffe hätte gerechnet werden müssen. (Freund [17]), Zipf [12]), Guttentag [16]) und Hülsmeier [18]).) Eine hinreichende Erklärung dafür kann vorläufig

nicht gegeben werden. Es kommen aber folgende Momente in Betracht. Verglichen mit der Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin und Histamin reagiert der Kaninchendünndarm gegenüber Adenylsäure relativ träge. Als zweiter Grund muß an die Gegenwart von Adenosin neben Adenylsäure gedacht werden. Adenosin wirkt ebenso wie Adenylsäure, ja sogar stärker. Mit der chemischen Methode wird es aber nicht erfaßt. Schließlich könnten die Extrakte noch andere darmhemmende Stoffe enthalten. Darauf weisen vielleicht folgende Versuche von Zipf hin: werden adenylsäurehaltige Organextrakte in 7%iger Schwefel- oder Salzsäure zwei Stunden im siedenden Wasserbad hydrolysiert, so verschwindet zwar die Kreislaufwirkung (Blutdrucksenkung usw)., die darmhemmende Wirkung ist aber häufig noch nachzuweisen. Ueber die chemische Natur des mutmaßlichen Stoffes ist bisher nichts bekannt.

Der Vergleich der beiden Methoden zeigt also, daß in diesem Falle die chemische Bestimmung der biologischen überlegen ist.

Eine gewisse Uebereinstimmung findet sich zwischen den chemisch gefundenen Werten und den von Bennet und Drury [13]) mit einer anderen biologischen Methode gefundenen. Diese Autoren verglichen die Wirkung von Organextrakten mit der Wirkung von Adenosinlösungen bekannten Gehalts am Meerschweinchenherzen in situ. Adenylsäure und Adenosin verursachen am Meerschweinchenherzen Herzblock. Die von ihnen ermittelten Werte sind zum Vergleich in Tabelle III und IV mit aufgeführt. Eine genaue Betrachtung zeigt, daß die Werte doch nicht ganz übereinstimmen. Vor allem fällt der niedrige Adenylsäuregehalt der zelligen Elemente des Blutes auf, ein Befund, der auch mit den Ergebnissen anderer Autoren nicht übereinstimmt. Sowohl die chemische wie die biologische Bestimmung des Adenylsäuregehalts der einzelnen Gewebe zeigen die weite Verbreitung dieses intermediären Stoffwechselprodukts, dem nach Zipf [1]) eine große physiologische Bedeutung zukommt.

Zum Schluß möchte ich Herrn Prof. Dr. Zipf und Herrn Prof. Dr. Freund für die freundliche Unterstützung, die sie mir bei meinen Arbeiten zuteil werden ließen, meinen besonderen Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Zur quantitativen Bestimmung des Adenylsäuregehalts in Organextrakten ist die Auswertung am Blutdruck, am überlebenden Meerschweinchenuterus nicht, und am isolierten Kaninchendünndarm nur bedingt geeignet.

2. Zur chemischen Bestimmung der Adenylsäure im Trichloressigsäurefiltrat eignet sich die Methode von Jackson. Neben der Adenylsäure anwesendes Adenosin wird mit der Methode nicht erfaßt.

3. Mit dieser Methode wurde die Verteilung der Adenylsäure in den Geweben des Kaninchens und Hundes untersucht.

4. Alle untersuchten Organe enthalten Adenylsäure. Der Gehalt schwankt zwischen 33,5 mg. (Blut) bis 60,7 mg. (Muskel) pro 100 Gramm Frischgewebe beim Kaninchen und zwischen 20,2 mg. (Herzmuskulatur) bis 94,5 mg. (Lunge) beim Hund.

Literatur.

1) K. Zipf,	Arch. f. exp. Pathol. 1931, Bd. 160, S. 592 Med. Klinik 1930. 26. Tg. S. 615, Sitz. d. med. naturws. Ges. Münster i. W. 30. VI. 1930; Klin. Wschr. 1931, Nr. 33, S. 1521.
2) R. Bass,	Arch. f. exp. Pathol. 1914, Bd. 76, S. 40.
3) H. Jackson jr.,	Journ. of biol. chem. 1923, Bd. 57, S. 121 und 1924, Bd. 59, S. 529.
4) W. S. Hoffmann,	ebenda 1925, Bd. 63, S. 675.
5) N. V. Buell u. M. E. Perkins	ebenda 1928, Bd. 76, S. 95 u. 123.
6) S. E. Thannhauser u. G. Czoniczer,	Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1920, Bd. 110, S. 307.
7) G. Embden u. M. Zimmermann,	ebenda 1927, Bd. 167, S. 137.
8) W. Jones u. M. E. Perkins,	Journ. of biol. chem. 1924/25, Bd. 62, S. 291.
9) G. Embden u. H. D. Deuticke,	Hoppe-Seylers Zeitschr. für physiol. Chemie 1930, Bd. 90, S. 62.
10) K. Pohle,	ebenda 1929, Bd. 184. S. 261 — N Drury und A. Szent-Györgyi, Journ. of physiol. 1929/30, Bd. 68, S. 213.
11) K. Pohle,	Hoppe-Seylers Ztschr. 1929. Bd. 185, S. 281.
12) K. Zipf,	Noch unveröffentlichte Befunde.
13) D. W. Bennet u. A. N. Drury,	The journ. of physiol. 1931, Bd. 3, S. 292.
14) H. Rothmann,	Ztschr. f. exp. Med. 1931, Bd. 77. S. 31.
15) Fr. Ellinger,	Arch. f. exp. Pathol. 1928, Bd. 136, S. 129.
16) O. E. Guttentag,	Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 1931, Bd. 162, S. 738
17) H. Freund,	Arch. f. exp. Pathologie. 1920. Bd. 86, S. 266.
18) P. Hülsmeier	Noch unveröffentlichte Befunde.

Lebenslauf.

Als Sohn des Katasterdirektors a. D. Baptist Schneider zu Lebach am 22. Januar 1908 geboren, besuchte ich die Volksschule zu Ahrweiler vom 6. Lebensjahre ab, anschließend das Realgymnasium Ahrweiler, wo ich Ostern 1927 mein Abitur bestand. Nach vorklinischem Studium der Zahnheilkunde in München und Bonn bestand ich in Letzterem mein Vorexamen und studierte dann in Münster, wo ich am 18. Dezember 1930 mein Staatsexamen bestand. Sodann widmete ich mich am Pharmakologischen Institut meiner Doctor-Dissertation.